



Title	ミトコンドリア型グルタミン酸オキサロ酢酸アミノ基 転移酵素（mGOT）前駆体型の諸性質
Author(s)	堀尾, 嘉幸
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34633
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていない ため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利 用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文につい てをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・（本籍）	ほり 堀	お 尾	よし 嘉	ゆき 幸
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6824	号	
学位授与の日付	昭和60年3月25日			
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻			
	学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	ミトコンドリア型グルタミン酸オキサロ酢酸アミノ基転移酵素 (mGOT) 前駆体型の諸性質			
論文審査委員	(主査) 教授 和田 博			
	(副査) 教授 山野 俊雄	教授 田川 邦夫		

論文内容の要旨

（目 的）

ミトコンドリア型グルタミン酸オキサロ酢酸アミノ基転移酵素（mGOT）は、核に遺伝子が存在し、細胞質で分子量が約2,000 ダルトン大きい前駆体型として合成されたあと、ミトコンドリアの外膜及び内膜の2枚の膜を透過してミトコンドリアマトリックスに局在化する。この機構を解明する目的で、前駆体型 mGOT の諸性質を明らかにする。

（方法ならびに成績）

- (1) SD系ラット肝臓500gより Huynh らの方法により mGOT 約25mgを精製し、1回0.5mgを Adjuvant とともに3週間おきに4回家兎に免疫し、抗 mGOT 血清を得た。
- (2) ウサギ兎網状赤血球溶解液はアセチルフェニルヒドラジン30mgを1日1回、1週間皮下注射した家兎赤血球より調製し、ヌクレアーゼで内在性mRNAを分解後セファデックスG-50でゲル濾過し、遊離アミノ酸を除去したものをを用いた。
- (3) total RNA はSD系ラット肝臓よりグアニジンチオシアネート塩化セシウム密度勾配遠心を用いて分離し、poly A-RNA はオリゴdT セルロースカラムを用いて得た。
- (4) ^{35}S -メチオニン存在下で、網状赤血球蛋白合成系を用いて前駆体型 mGOT を合成し、別に分離調製したラット肝臓ミトコンドリアを等張条件下で incubation したあと、ミトコンドリア内にとりこまれた蛋白質を SDS-PAGE フルオログラフィーで分析した。前駆体型 mGOT は、時間とともにミトコンドリア内にとりこまれ、同時に分子量も2000 ダルトン小さい成熟型に転換した。
- (5) ラット肝臓 poly A-RNA を ^3H -プロリン、または ^3H -ロイシン、または ^{35}S -メチオニンと

その他の19種類の“コールド”アミノ酸の存在下で網状赤血球蛋白合成系を使ってトランスレーションし、抗 mGOT 抗体とプロテイン A を用いて前駆体型 mGOT を免疫沈澱させた。この免疫沈澱産物を Edman 分解し、各ステップに回収されるアイソトープ量をシンチレーションカウンターにより測定した。これにより前駆体部分の mGOT 構造は N 末端より Met-Leu-Leu-X-X-Leu-Pro-X-X-Leu-Leu-Leu-であることがわかった。(X: Unknown)

(6) 前駆体型 mGOT の分子量の測定

網状赤血球蛋白合成系を使って合成した前駆体型 mGOT を含む分画を SDS 存在下及び非存在下で HPLC-TSKSW 3000 ゲル濾過カラムにかけ、各フラクションを抗 mGOT 抗体と反応させた後、SDS-PAGE で分析し、前駆体型 mGOT の分子量を測定した。この結果 SDS 非存在下では前駆体型 mGOT は成熟型 mGOT と同じく二量体の構造をとり、SDS 存在下で一量体になることが示唆された。

(7) 前駆体 mGOT と補酵素 (ピリドキサルリン酸) の結合

mGOT はピリドキサルリン酸 (PLP) を補酵素として結合している。前駆体型 mGOT と PLP の関係を知るために、網状赤血球蛋白合成系を使って合成した分画に関して PLP 除去した“apo 状態”と PLP を添加した“holo 状態”を作り、PLP を結合させた AH-セファロースカラムとの結合性を見た。前駆体型 mGOT は“holo 状態”では PLP-カラムに結合せず“apo 状態”にすると PLP カラムに結合した。この結果、前駆体型 mGOT も補酵素を結合し得ることがわかった。

(8) ラット mGOT cDNA のクローニング

前駆体型 mGOT の構造を決定するためにラット mGOT cDNA のクローニングを試みた。pUC8 発現ベクターに組み込んだラット肝臓 cDNA ライブラリー約 5 万個を抗 mGOT 抗体でスクリーニングし、抗体と反応性のあるクローン pm-1 を得、解析中である。

(総括)

- 1) 前駆体型 mGOT は成熟型への分子量の減少を伴って、ミトコンドリア内に取り込まれた。
- 2) ミトコンドリア内への局在化機構をになう mGOT の前駆体部分の一部の構造をラジオシーケンズ法で決定した。
- 3) 前駆体型 mGOT は二量体の構造をとり、かつ補酵素のピリドキサルリン酸を結合でき、成熟型 mGOT と非常に近い性質をすでにもっていることが示された。
- 4) ラット mGOT cDNA のクローニングを行い抗 mGOT 抗体と反応するクローン pm-1 を得た。

論文の審査結果の要旨

ラットの mGOT をウサギ網状赤血球蛋白合成系を使って *in vitro* で合成したところ、mGOT は精製した mGOT より分子量が約 2,000 大きな前駆体型として合成され、また、*in vitro* の系でミトコンドリアと共存させることにより、この前駆体型 mGOT はミトコンドリア内に移行した。前駆体型

mGOT は成熟型 mGOT と同様に二量体として存在し、また、補酵素ピリドキサル 5'-リン酸を結合することが出来、成熟型 mGOT と非常に近い性質を持っていた。これを用い、前駆体の N 末端部の構造を決定し、疎水性アミノ酸が多いことを明らかとした。

以上は、mGOT のミトコンドリア内局在化機構を解明する上でいづれも重要な手掛りを与えるものであり、この方面の研究に新しい展開をもたらしたものとして、学位論文として推薦し得る。